

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 A61K 9/127, 47/48, 39/395, A61P 35/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/64413 (43) 国際公開日 2000年11月2日(02.11.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02596 (22) 国際出願日 2000年4月20日(20.04.00) (30) 優先権データ 特願平11/115737 1999年4月23日(23.04.99) JP 特願平11/115738 1999年4月23日(23.04.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 三菱化学株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION)[JP/JP] 〒100-0005 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 田川俊明(TAGAWA, Toshiaki)[JP/JP] 細川斉子(HOSOKAWA, Saiko)[JP/JP] 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 三菱東京製薬株式会社 横浜研究所内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 松山直行, 外(MATSUYAMA, Naoyuki et al.) 〒103-8405 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱東京製薬株式会社内 Tokyo, (JP)	(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書	
<p>(54) Title: ANTIBODY AND POLYALKYLENE GLYCOL-BONDED LIPOSOME</p> <p>(54) 発明の名称 抗体およびポリアルキレングリコール結合リポソーム</p> <p>(57) Abstract A liposome constructed by bonding a compound having a polyalkylene glycol moiety to a liposome, which has been converted into maleimide in a part of lipid ends, via a thioether group and further bonding an antibody via the thioether group, wherein the ratio of the bonded compound and the bonded antibody are respectively from 15 to 50 % by mol and from 0.1 to 2 % by mol each per mol of the maleimide lipid contained in the liposome. This liposome is excellent both in the retentivity in the blood and therapeutic effect.</p>		

(57)要約

脂質末端の一部がマレイミド化されたりポソームに、
ポリアルキレングリコール部分を含む化合物をチオエー
テル基を介して結合し、さらに抗体をチオエーテル
基を介して結合したりポソームであって、該化合物の
結合量及び該抗体の結合量がそれぞれリポソームに含
まれるマレイミド化脂質 1 モルに対して 15 ~ 50 モ
ル % 及び 0.1 ~ 2 モル % であるリポソーム。該リポ
ソームは優れた血中滞留性と治療効果を併せもつ。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア				
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮				
DE	ドイツ	KR	韓国				
DK	デンマーク						
				RO	ルーマニア		

明細書

抗体およびポリアルキレングリコール結合リポソーム

5 技術分野

本発明は、リポソームに関する。より具体的には、抗体及び／又はポリアルキレングリコールが結合されており、優れた血中滞留性と治療効果を併せもつリポソームに関する。

10

背景技術

薬剤を特定部位に大量に輸送する手段として、リポソームに薬剤を封入し、その表面に抗体を結合する方法が提案されている。特に、癌治療の分野において、
15 抗腫瘍剤を封入した抗体結合リポソームの有効性が数多く報告されている (Konno et al., Cancer Res., 47, 4471, 1987; 特開昭58-134032号公報)。さらに、リポソームの問題点、すなわち封入物の漏出や、リポソームの凝集及び網内系器官での捕捉などを改善する
20 方法として、リポソームにポリエチレングリコールを結合する方法が提案されている (特開平1-249717号公報、特開平2-149512号公報、Klibanov et al., FEBS Lett., 268, 235, 1990)。

特開平4-346918号公報には、薬剤を内包するリポソーム表面のマレイミド基と、各々のチオール基を介して結合する蛋白質及びポリアルキレングリコール部分を含む化合物残基を有することを特徴とする薬剤含有蛋白質結合リポソームが開示されている。このリポソームは、リポソーム表面のマレイミド基に対して、抗

体に結合したチオール基とポリアルキレングリコール部分を含む化合物に結合したチオール基とを反応させることによって製造され、従来のリボソームでみられたような肝臓、脾臓などの網内系での非特異的取り込みが抑制されており、選択的な化学療法を達成できるという特徴がある。

上記公報には、リボソームに結合するポリアルキレングリコール部分を含む化合物の量は具体的に説明されていないが、マレイミド基（マレイミド化脂質）1
10 モルに対して0.1モル%から20モル%のチオール化抗体を反応させ、残存したマレイミド基に対して過剰量のチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物、好ましくは2倍等量以上を加え抗体結合ポリアルキレングリコール修飾リボソームを得ることが
15 記載されている（0016段落）。また、実施例に具体的に記載されたリボソームの製造方法では、全脂質100mgに対して5 μ モルのチオール化ポリエチレングリコール部分を含む化合物（換算すると全脂質に対して3.1モル%）を反応させており、脂質に対して大過剰のチオール化ポリエチレングリコール部分
20 を含む化合物を反応させることにより、理論量（リボソーム表面に残存したマレイミド基の量）のポリエチレングリコールで修飾されたリボソームを得ているものと考えられる。

25 また、上記公報には、リボソームに結合する抗体の量も具体的に説明されていないが、マレイミド基（マレイミド化脂質）1モルに対して0.1モル%から20モル%のチオール化抗体（換算すると全脂質100mgに対して0.3～60mg）を反応させることが

説明されているが、実施例に具体的に記載されたりポソームの製造方法では、全脂質 100 mg に対して 5 mg (換算するとマレイミド化脂質に対して 1.7 モル%) の抗体を結合させており、上記公報には、それ
5 以外の結合量についての具体的開示はない。

発明の開示

本発明者らは、特開平 4-346918 号公報に記載されたりポソームを基にして、さらに高い血中滞留性を有するとともに、安全性に優れたりポソームを提供すべく
10 鋭意研究を行った。その結果、特開平 4-346918 号公報に記載されたりポソームにおいて、りポソームを修飾するポリアルキレングリコールの量を理論値 (りポソーム表面に残存したマレイミド基の量) よりも低減させたところ、驚くべきことに、修飾量が理論値よりも
15 少ないりポソームにおいても従来公知のりポソームとほぼ同等の血中滞留性が得られることを見出した。

また、本発明者らは、特開平 4-346918 号公報に記載されたりポソームを基にして、さらに高い治療効果を達成できるりポソームを提供すべく鋭意研究を行った。
20 その結果、特開平 4-346918 号公報の実施例に記載されたりポソームにおいて、抗体の結合量を低減させたところ、驚くべきことに、上記公報の実施例に記載されたりポソームよりもはるかに高い治療効果を達成できることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして
25 完成されたものである。

すなわち本発明は、脂質末端の一部がマレイミド化されたりポソームにポリアルキレングリコール部分を含む化合物をチオエーテル基を介して結合したりポソ

ームであって、該化合物の結合量がリポソームに含まれるマレイミド化脂質 1 モルに対して 15 ~ 50 モル % であるリポソーム ; 該化合物の結合量がマレイミド化脂質 1 モルに対して 15 ~ 30 モル % である該リポソーム ; 該リポソームが、マレイミド化脂質のマレイミド基と、チオール基を付加したポリアルキレングリコール部分を含む化合物とを反応させることにより得られるリポソームである該リポソーム ; 該化合物がリポソームの表面に結合した該リポソーム ; ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである該リポソーム ; 該化合物が 2 つのポリエチレングリコール基を有する化合物である該リポソーム ; ポリエチレングリコールの分子量が 2,000 ~ 7,000 ダルトンである該リポソーム ; ポリエチレングリコールの分子量が約 5,000 ダルトンである該リポソーム ; リポソームの表面にさらに抗体が結合した該リポソームが提供される。

また、脂質末端の一部がマレイミド化されたりポソームに抗体をチオエーテル基を介して結合したりポソームであって、該抗体の結合量がリポソームに含まれるマレイミド化脂質 1 モルに対して 0.1 ~ 2 モル % であるリポソーム ; 該抗体の結合量がマレイミド化脂質 1 モルに対して 0.4 ~ 0.7 モル % である該リポソーム ; 該リポソームが、マレイミド基を有するリポソームと抗体由来のイオウ含有基とを反応させてチオエーテル結合を形成することにより得られるリポソームである該リポソーム ; 抗体が GAH 抗体である該リポソーム ; 抗体が抗体フラグメントが F (a b) である該リポソーム ; リポソームの表面にさらにポリアル

キレングリコール部分を含む化合物が結合した該リポソームが提供される。

- また、脂質末端の一部がマレイミド化されたリポソームにポリアルキレングリコール部分を含む化合物及び抗体をチオエーテル基を介して結合したリポソームであって、該化合物の結合量及び該抗体の結合量が、リポソームに含まれるマレイミド化脂質 1 モルに対して 15 ~ 30 モル% 及び 0.4 ~ 0.7 モル% であるリポソーム；該リポソームが、マレイミド化脂質のマレイミド基と、チオール基を付加したポリアルキレングリコール部分を含む化合物とを反応させることにより得られるリポソームである該リポソーム；該化合物がリポソームの表面に結合した該リポソーム；ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである該リポソーム；該化合物が 2 つのポリエチレングリコール基を有する化合物である該リポソーム；ポリエチレングリコールの分子量が 2,000 ~ 7,000 ダルトンである該リポソーム；ポリエチレングリコールの分子量が約 5,000 ダルトンである該リポソーム；該リポソームが、マレイミド基を有するリポソームと抗体由来のイオウ含有基とを反応させてチオエーテル結合を形成することにより得られるリポソームである該リポソーム；抗体が G A H 抗体である該リポソーム；抗体が抗体フラグメントが $F(ab')$ である該リポソームが提供される。

また、癌治療薬である該リポソーム；癌種が胃癌又は大腸癌である該癌治療薬；該リポソームを用いた癌治療方法が提供される。

図面の簡単な説明

第1図は、リポソーム（D X R封入、抗体非結合）に結合したポリエチレングリコール量と血漿中D X R濃度との関係を示した図である。横軸はPEG量（D P P C 1モルに対するモル%）を示す。全脂質に対するモル%及びマレイミド化D P P E 1モルに対するモル%の換算値は、それぞれ0.16及び8.9（0.25）；0.32及び17.8（0.5）；0.48及び26.7（0.75）；0.64及び35.6（1）；並びに0.81及び45（1.25）である（カッコ内はD P P C 1モルに対するモル%を示す）。

第2図は、リポソーム（D X R封入、抗体結合）に結合したポリエチレングリコール量と血漿中D X R濃度との関係を示した図である。横軸はPEG量（100mg脂質に対するPEG量（mg））を示す。D P P C 1モルに対するモル%、全脂質に対するモル%、及びマレイミド化D P P E 1モルに対するモル%の換算値は、それぞれ0.25、0.16、及び8（2.5）；0.50、0.31、及び17（5）；0.75、0.47、及び26（7.5）；並びに1.0、0.62、及び34（10）である（カッコ内は100mg脂質に対するPEG量（mg）を示す）。

第3図は、リポソーム（D X R封入）に結合した抗体量と腫瘍抑制効果（%T/C）との関係を示した図である。

第4図は、抗体結合量を2mg/100mg脂質以上とした各サンプルについて血漿中D X R量（血中滞留性）と抗体結合量との関係を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明のリボソームを構成する脂質としては、例えば、天然レシチン（例えば、卵黄レシチン、大豆レシチン）やジパルミトイルフォスファチジルコリン（D P P C）、ジミリストイルフォスファチジルコリン（D M P C）、ジステアロイルフォスファチジルコリン（D S P C）、ジオレオイルフォスファチジルコリン（D O P C）、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン（D M P E）、ジパルミトイルフォスファチ
10 ジルエタノールアミン（D P P E）、ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン（D O P E）、ジパルミトイルフォスファチジン酸（D P P A）、ジパルミトイルフォスファチジルグリセロール（D P P G）、ジミリストイルフォスファチジン酸（D M P A）等の
15 リン脂質、スフィンゴ糖脂質、グリセロ糖脂質等の糖脂質、脂肪酸、両親媒性ジアルキルジメチルアンモニウム（dialkyl dimethylammonium amphiphiles）、ポリグリセロールアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル等（Liposome Technology, 2nd e
20 dition, vol.1, 141, 1993）、アルキルグリコシド、アルキルメチルグルカミド、アルキルシュークロースエステル、ジアルキルポリオキシエチレンエーテル、ジアルキルポリグリセロールエーテル等（Liposome Technology, 2nd edition, vol.1, 141, 1993）、ポリオ
25 キシエチレンーポリ乳酸等の両親媒性ブロック共重合体等（特表平6-508831号公報）などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。これらの脂質は単独で、又は2種以上を組み合わせて用いることができ、さらにコレステロール等の非極性物質、D C

-cholesterol (3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethyl)carbamoyl]cholesterol) 等のコレステロール誘導体と組み合わせ用いてもよい。

5 本発明のリポソームにおいては、ポリアルキレングリコールを含む化合物及び必要に応じて抗体などの蛋白質の結合のために、脂質成分の一部として、例えばマレイミド化フォスファチジルエタノールアミンなどのマレイミド化された脂質（本明細書において「マレイミド化脂質」と呼ぶ。）を用いる必要がある。全脂質に対するマレイミド化脂質の割合は、通常、約0.10
10 5～10モル%である。

マレイミド化フォスファチジルエタノールアミンの例で説明すると、この化合物はアミノ基に反応性を有するマレイミド含有化合物とフォスファチジルエタノールアミン（PE）のアミノ基との反応により得られる。該マレイミド含有化合物はカプロイル基、ベンゾイル基、フェニルブチリル基等の残基を含んでいてもよく、例えば、N-（ ϵ -マレイミドカプロイルオキシ）スクシンイミド、N-サクシンイミジル4-（p-
15 マレイミドフェニル）ブチレート、N-サクシンイミジル4-（p-マレイミドフェニル）プロピオネート、N-（ γ -マレイミドブチリルオキシ）スクシンイミド等を挙げることができる。PEとしてはジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン（DPP
20 E）、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン（DMPE）、ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン（DOPE）等のフォスファチジルエタノールアミン類が使用できるが、好ましくはDPP
25 Eである。脂質成分として、さらにステアリルアミン、

ジセチルフォスフェートなどの荷電性物質を含んでもよい。また、本発明のリポソームは、ウイルスの一部または全部を組み込んだ融合リポソーム、例えばセンダイウイルスとリポソームを融合したリポソーム
5 であつてもよい。

典型的なリポソームとしては、例えば、フォスファチジルコリン 1 モルに対して、コレステロールを 0.3 ~ 1 モル、好ましくは 0.4 ~ 0.6 モル、マレイミド化フォスファチジリエタノールアミンを 0.01
10 ~ 0.2 モル、好ましくは 0.02 ~ 0.1 モル、さらに好ましくは 0.02 ~ 0.05 モルを含む脂質組成物を用いることができ、フォスファチジン酸を加える場合には 0.4 モル以下、好ましくは 0.15 モル以下の脂質組成物を用いることができる。

15 本発明のリポソームの製造方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法はいずれも適用可能である。また、本発明のリポソームの形態も特に限定されず、いかなる形態であつてもよい。例えば、ガラス壁に付着させた脂質薄膜に水溶液を加え、機械的振盪を加えて形成するマルチラメラリポソーム (MLV) ; 超音波処理法、エタノール注入法、フレンチプレス法により得られるスモールユニラメラリポソーム (SUV) ;
20 界面活性剤除去法、逆相蒸発法 (リポソーム、砂本順三ら、南江堂、1998)、MLV を均一孔径を有するメンブランから加圧により押し出すイクストゥルージョン法等によって得られるラージユニラメラリポソーム (LUV) のいずれであつてもよい (Liposome Technology 2nd edition vol.1, 141, 1993)。リポソームの粒径は、例えば、300 nm 以下、好ましくは 30
25

から 200 nm 程度である。

本発明のリポソームには医薬を封入することができる。医薬の種類は特に限定されないが、例えば、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、ダウノマイシン、
5 ビンブラスチン、シスプラチン、5-フルオロウラシル（5-FU）等の抗腫瘍剤；チモロール等のアドレナリン遮断剤；クロニジン等の高血圧剤；プロカインアミド等の制吐剤；クロロキニーネ等の抗マラリア剤；並びにそれらの薬学的に許容し得る塩及び誘導
10 体；レニウム 186、ヨード 131、イットリウム 90 等の放射性物質；リシン A、ジフテリマトキシン、TNF などの生理活性物質及びそれらをコードする DNA などを用いることができる。もつとも、本発明のリポソームに封入可能な医薬はこれらに限定されること
15 はない。

上記医薬の薬学的に許容し得る塩としては、薬学的に許容し得る多価陰イオン性物質との塩、例えば、クエン酸塩、酒石酸塩、グルタミン酸塩、及びそれらの誘導体との塩が好ましい。本発明のリポソームに封入
20 する医薬としては、抗腫瘍剤が好ましい。本発明のリポソームには、治療用の医薬のほか、診断用の医薬を封入することもできる。診断用の医薬としては、放射性元素、例えばインジウム、テクネチウム等のイメージング薬剤；ヨード、ガドリニウム等の造影剤；ホ
25 ースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ等の酵素；ユーロピウム誘導体などの蛍光体；N-メチルアクリジウム誘導体等の発光体などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。

これらの医薬をリポソームに導入する方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法はいずれも適用可能である。例えば、リポソーム形成時に水溶液として添加してリポソーム内部に封入してもよい。また、リポソーム形成後、ベジクル内外にpH勾配などの濃度勾配を形成し、このポテンシャルを駆動力としてイオン化可能な薬剤をリポソーム内部に取り込ませる方法 (Cancer Res., 49, 5922, 1989; BBA, 455, 269, 1976) などを用いることができる。

10 本発明のリポソームは、ポリアルキレングリコール部分を含む化合物で修飾されており、さらに特定量の抗体で修飾されていることを特徴としている。ポリアルキレングリコールとしては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコールなどを用いることができるが、ポリエチレングリコールを用いることが好ましい。ポリエチレングリコールを用いる場合には、分子量が2,000～7,000ダルトン程度のもの、好ましくは約5,000ダルトン程度のものを用いることができる。

20 本発明のリポソームは、上記ポリアルキレングリコール部分を含む化合物がリポソーム表面のマレイミド化脂質にチオエーテル結合を介して結合した形態を有しているが、通常、ポリアルキレングリコールを含む化合物にチオール基を導入した後、この化合物をリポソームのマレイミド基と反応させることにより、ポリアルキレングリコールを結合させたリポソームを製造することができる。ポリアルキレングリコールを含む化合物としては、通常、ポリエチレングリコール基を有し、かつ末端をチオール化可能な化合物又は末端に

メルカプト基を有する化合物を挙げることができる。
具体的には、例えば、ポリアルキレングリコール基を
トリアジンに結合した化合物、さらに該トリアジンが
アミノ酸などにより置換された化合物を挙げることが
5 できる。この際、ポリアルキレングリコール基を2つ
有する化合物（2本鎖）であってもよい。

ポリアルキレングリコールとしてポリエチレングリ
コールを用いる場合には、例えば、モノメトキシポリ
オキシエチレンアミンと各種チオールカルボン酸とを
10 脱水縮合する方法；モノメトキシポリオキシエチレン
アミンにSPDPでピリジルジチオプロピオニル基を
導入し、さらに還元する方法；モノメトキシポリオキ
シエチレンアミンにイミノチオランによりチオール基
を導入する方法；モノメトキシポリオキシエチレンカ
15 ルボン酸の活性エステルと各種チオールアミンを結合
させる方法；ポリエチレングリコールトリアジン誘導
体をチオールアミンと縮合する方法などを利用するこ
とができる。さらに具体的には、2,4-ビス（ポチエチ
レングリコール）-6-クロロ-s-トリアジン（活性化P
20 E G 2（生化学工業株式会社製））をシスチンと反応
させ、さらに還元してシステイン結合活性化PEG2
を得ることができる。

本発明のリポソームにおけるポリアルキレングリコ
ール部分を含む化合物の導入量は特に限定されず、残
25 存マレイミド化脂質に対して過剰に反応させてもよい
が、ポリアルキレングリコールの好ましい導入量とし
ては、全脂質に対して0.28～0.90モル%程度、
より好ましくは0.28～0.56モル%程度、マレ
イミド化脂質に対しては15～50モル%程度、より

好ましくは 15 ~ 30 モル % 程度であり、DPPC に対して 0.44 ~ 1.45 モル % 程度、より好ましくは 0.44 ~ 0.89 モル % 程度である。

本発明のリポソームは蛋白質、すなわち抗体で修飾
5 されていてもよい。蛋白質としては、例えば、抗体、
FGF、EGF などの種々の生理活性物質を用いるこ
とができるが、好ましくは抗体を用いることができる。
抗体としては、抗体自体又は抗体フラグメント、又は
抗体誘導体などを用いることができるが、抗体として
10 は、抗体自体、又は抗体フラグメントのいずれを用い
てもよい。本明細書において用いられる「抗体」とい
う用語は、抗体自体及び抗体フラグメントのほか、誘
導化又は修飾した抗体などを包含しており、最も広義
に解釈しなければならない。また、抗体としては、治
15 療対象となる組織、細胞、細菌、ウイルス等と反応性
を有する抗体を利用することができる。例えば、各種
動物のポリクローナル抗体、マウスモノクローナル抗
体、ヒトマウスのキメラ抗体、ヒトモノクローナル
抗体などを用いることができる。異種動物の蛋白質で
20 はない点から、ヒトモノクローナル抗体がより好まし
い。抗体としては、特開平 5-304987 号公報に記載され
たヒトモノクローナル抗体（GAH 抗体）を好適に用
いることができ、例えば、上記公報の例 7 に具体的に
示された方法に従って、GAH 抗体で修飾したリポソ
25 ームを製造することができる。特開平 5-304987 号公報
に記載のとおり、GAH 抗体は、胃癌及び大腸癌に反
応性を有するので、本願のリポソームは胃癌や大腸癌
等の癌治療薬として有用である。抗体の種類と封入す
べき医薬との組み合わせを適宜選択することにより、

治療効果に優れたリポソームを製造することができる。

抗体にチオール基を付与した後、リポソームのマレイミド基と該チオール化抗体とを反応させることによって、リポソームを抗体で修飾することができる。抗体へのチオール基の付与は、抗体のアミノ基に対して、蛋白質のチオール化に通常用いるN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピネート(SPD P)(Carlsson, J., et al., Biochem. J., 173, 723, 1978)やイミノチオラン、メルカプトアルキルイミデート(Traut, R.R., et al., Biochemistry, 12, 3266, 1973)等の化合物を反応させる方法により行なうことができる。また、抗体の内在性ジチオール基を還元してチオール基として反応させることもでき、抗体活性の維持の点から内在性チオール基を用いる方法は好適である。

例えば、IgGを用いる場合はペプシン等の酵素でF(ab)₂化し、さらにジチオスレイトール等で還元して得られるF(ab)₂に生じるチオール基をリポソームとの結合反応に利用することができる(Martin, F.J., et al., Biochemistry, 20, 4229, 1981)。IgMの場合には、ミラーらの方法(J. Biol. Chem., 257, 286, 1965)に準じ、緩和な条件でJ鎖を還元して得られるIgMsのFc部分のチオール基をリポソームとの結合に利用すればよい。特開平5-304987号に記載されたGAH抗体を用いる場合には、F(ab)₂を用いることが好適である。チオール基が付与された抗体などの蛋白質とマレイミド基を含むリポソームとの結合は、中性の緩衝液(pH 6.5~7.5)中で2~16時間反応させることにより達成される。

本願の最も好ましい実施態様は、抗体及びポリアルキレングリコール部分を含む化合物とが結合されたり
リボソームであり、これを製造するためには、まず、マ
レイミド基を有するリボソームに対して中性の緩衝液
5 中でチオール化抗体を反応させる。例えば、リボソームを構成する全脂質 100 mg あたり 0.5 ~ 5.3 mg、0.5 ~ 4.5 mg、好ましくは 1.2 ~ 2 mg の抗体が結合するように、すなわちチオール化抗体をマレイミド基（マレイミド化脂質）1 モルに対して、
10 0.1 モル%（具体的には 0.17 モル%）から約 2 モル%程度（具体的には 1.5 モル%、1.8 モル%）、好ましくは 0.4 ~ 0.7 モル% 反応させればよい。
ついで、残存しているマレイミド基に対してチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物を反応
15 させ、抗体とポリアルキレングリコール部分を含む化合物とが結合したりリボソームを製造することができ、具体的には、マレイミド化脂質基 1 モルに対して、15 モル% から 50 モル%、好ましくは 15 ~ 30 モル%（全脂質に対して 0.28 ~ 0.90 モル%、好ましくは 0.28 ~ 0.56 モル%、DPPC を用いる場合には、DPPC に対して 0.44 ~ 1.45 モル%、好ましくは 0.44 ~ 0.89 モル%）のチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物を加え、抗体とポリアルキレングリコール部分を含む化
20 合物が結合したりリボソームを製造することができる。

本発明のリボソームの好ましい態様により、医薬、好ましくはドキソルビシンなどの抗腫瘍剤が封入されており、ポリエチレングリコール部分を含む化合物と抗腫瘍抗体とが結合したりリボソームが提供される。上

記の医薬含有リポソームは、公知の方法、例えば、脱水法（特表平2-502348号公報）、安定化剤を加え液剤として用いる方法（特開昭64-9331号公報）、凍結乾燥法（特開昭64-9931号公報）等により製剤化することができ、癌などの各種疾患の治療のために、血管内投与、膀胱内投与、腹腔内投与、局所投与などの方法で患者に投与することができる。投与量は有効成分の医薬の種類に応じて適宜選択することができるが、例えばドキソルビシンを封入したリポソームを投与する場合には、有効成分量として50 mg / kg 以下、好ましくは10 mg / kg 以下、より好ましくは5 mg / kg 以下で用いることができる。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は以下の実施例に限定されることはない。

実施例 1

(1) リポソームの調製及び薬物の封入

ジパルミトイルフォスファチジルコリン(DPPC) / コレステロール / ϵ -マレイミドカプロイルジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン(MC-DPPE) (18 / 10 / 0.5モル比) からなる脂質混合物 (1.6 g) に0.3 Mクエン酸緩衝液 (pH 4.0) 16 mL を添加し、水和した後、液体窒素と60℃の温浴で凍結融解を3回行ないマルチラメラリポソームを作製した。さらに押出し法により0.1 μ m に整粒した。このリポソーム溶液に1 M NaOH

を滴下して中和した後、60℃に加温し、20 mg / mL のドキソルピシン (DXR、別名アドリアマイシン、ADM) 水溶液を脂質 100 mg あたり 0.5 mL 添加して封入した。

5 (2) 抗体のチオール化及びリボソームへの結合 (抗体結合リボソームの作製)

1 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解した GAH 抗体 (特開平 4-346918 号公報、特開平 5-304987 号公報に記載の
10 もの、胃癌及び大腸癌反応性モノクローナル抗体、3 mg / mL、14.4 mL) に 3 mg / mL のイミノチオランを 92.4 μ L 添加し、37℃で1時間反応させてチオール基を導入した (Biochemistry, 12, 3206, 1973 参照)。反応液をゲルろ過し、緩衝液を 1 mM
15 MEDTA を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に交換した後、ドキソルピシン 1 mg あたり 0.21 mg のチオール化抗体 (1.7 mg / mL) を加えて 25℃で1時間反応させ、リボソームに抗体を結合させた。

20 (3) ポリエチレングリコールのチオール化及びリボソームへの結合 (PEG 結合リボソームの作製)

特開平 4-346918 号公報の方法に従って、2, 4-ビス(ポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジンにシスチンを反応後、還元してチオール基を有する
25 るポリエチレングリコール (2 本鎖型の PEG) を調製した。すなわち、シスチンを用いてチオール化 PEG (30 mg / mL、PEG 分子量 2000 の 2 本鎖型 (PEG 2000) 又は PEG 分子量 5000 の 2 本鎖型 (PEG 5000)) を製造し、上記の反応液

1 mL あたり 0.18 mL 添加して、10℃で結合反応を行なった。反応開始後5～240分後にサンプリングしてセファロースCL6Bカラムにアプライし、未反応のチオール化PEGを除いて反応を停止し、PEG量の異なるイムノリボソームを作製した。PEG非結合イムノリボソームは、PEG結合操作をしていないイムノリボソームを同様にセファロースCL6Bでゲルろ過することで作製した。

(4) 抗体及びPEG結合リボソームの作製

10 上記(2)で調製した抗体結合リボソームに対し、上記(3)中のチオール化PEGを反応させることで抗体及びPEGの結合したリボソームを作製した。

(5) 結合PEG量の定量

15 イムノリボソームに結合したPEG量はHPLC法により測定した。終濃度2%SDS溶液としたイムノリボソーム溶液を60℃で30分間加温し、リボソームを完全に可溶化した。GPCカラム(東ソー株式会社製、2000SWXL)を用い、pH7.5の緩衝液(25mMNaH₂PO₄、0.1%SDS、70%メタノール)で溶離してPEGを分離し、215nmで検出してエリア値から定量した。

(6) DXR定量

25 サンプル50μLを50%プロパノール/0.5M塩酸950μLに添加し、500nmの吸光度を測定してDXRを測定した。

(7) 結合抗体量の定量

PEG量の定量と同様にして、GPCカラム(東ソー株式会社製、3000SWXL)を用い、pH7.0の緩衝液(25mMNaH₂PO₄、200mMNa

、S O 、 0 . 1 % S D S) で溶離して抗体を分離し、抗体ピークの 280 nm で検出されるエリア値から定量した。

(8) 脂質量の定量

- 5 脂質 (D P P C 及びコレステロールの総量) は H P L C 法により定量した。L - カラム O D S (化学品検査協会) 4 . 6 m m × 2 5 0 m m に負荷し、テトラヒドロフラン (T H F) / アセトニトリル / 水 (2 : 1 : 1 、 V / V / V 、 0 . 1 % トリフルオロ酢酸) で溶離
- 10 した。215 nm で検出を行ない、D P P C に由来するピーク及びコレステロールに由来するピークのエリア値から定量した。脂質定量用サンプルはリボソームサンプル 1 容に対して上記溶離液 9 容を加えて調製した。

15

実施例 2 : P E G 結合リボソームの作製 (体内動態試験)

- 20 実施例 1 の方法に従って、リボソームを構成する全脂質 1 モルに対して 0 ~ 約 0 . 7 モル % 、 D P P C 1 モルに対して 0 ~ 約 1 モル % 、マレイミド化脂質 1 モルに対して 0 ~ 約 4 0 モル % の P E G を導入したリボソーム (D X R 封入、抗体非結合、P E G 2 0 0 0 又は P E G 5 0 0 0 結合) を調製した。

< 表 1 >

リポソーム	DXR濃度 (ng/ml)	PEG量*	PEG量**	PEG量***
1	1.14	0.083(PEG5000)	0.13	4.61
2	1.17	0.22 (PEG5000)	0.34	12.2
3	1.27	0.40 (PEG5000)	0.63	22.2
4	1.32	0.48 (PEG5000)	0.75	26.7
5	1.16	0.096(PEG2000)	0.15	5.33
6	1.08	0.30 (PEG2000)	0.47	16.7
7	1.47	0.60 (PEG2000)	0.94	33.3
8	1.55	0.70 (PEG2000)	1.09	38.9
9	3.49	-	-	-

* 全脂質に対するモル%

** DPPC 1モルに対するモル%

***マレイミド化脂質DPPE 1モルに対するモル%

BALB/c Ajcl 雄性マウス（6週齢）を実験に使用した。各リポソームについて1群4匹とし、ブランクとして非処理マウス1匹を実験に供した。DXR量として2mg/kgとなるように尾静脈内にリポソームを投与した。投与16時間後、マウスにネブタール注射液（大日本製薬株式会社製）を腹腔内投与し、麻酔下に開胸して採血し、血漿を分離してDXRの分析に供した。

血漿100μLに0.3M塩酸-50%エタノール（塩酸エタノール）1mLを加え、60℃で10分間加熱してDXRを抽出し、4℃に冷却して15000rpmで10分間遠心して上清を採取した。この試料を塩酸エタノールで4倍に希釈し、励起波長490nm、蛍光波長590nmの蛍光を測定した。塩酸エタノールで希釈した既知濃度のDXRを用いて検量線を作製し、血漿中のDXRを定量した。なお、マウス血漿からのDXR回収率は、DXR換算3.75μg/mL～30μg/mLの範囲において95～98%で

あった（参考文献：Cancer Res., 47, 4471, 1989）。

各リポソーム群についての血漿中DXR濃度の平均値（±標準偏差）を第1図に示す。リポソームの血中滞留性の指標となる血漿中DXR濃度は、PEG 5000及びPEG 2000ともに、リポソームに結合したPEG量に依存して増加することが確認された。

実施例3：PEG及び抗体結合リポソームの作製（体内動態試験）

10 実施例1の方法に従って、リポソーム全脂質に対して0～0.6モル%、DPPCに対して0～約1モル%、マレイミド化DPPEに対して0～約30モル%のPEGを導入したリポソーム（DXR封入、抗体結合、PEG 5000 結合）を調製した。

15 <表2>

リポソーム	DXR濃度 (mg/100mg 脂質)	抗体 (mg/100mg 脂質)	PEG 量*	PEG 量**	PEG 量***
1	10.2	1.5	0	0	0
2	10.4	1.6	0.06	0.10	3
3	10.3	1.6	0.10	0.16	5
4	10.3	1.6	0.15	0.24	8
5	11.1	1.6	0.28	0.44	15
6	10.5	1.6	0.30	0.48	16
7	10.2	1.6	0.36	0.56	19
8	11.0	1.8	0.48	0.76	26
9	10.8	1.3	0.52	0.82	28
10	10.8	1.7	0.61	0.97	33

* 全脂質に対するモル%

** DPPC 1モルに対するモル%

***マレイミド化DPPE 1モルに対するモル%

実施例2と同様にして血漿中のDXRを定量した。
各リポソーム群についての血漿中DXR濃度の平均値

(±標準偏差)を第2図に示す。血漿中D X R濃度は、リポソームに結合したP E G量に依存して増加したが、全脂質に対して約0.3モル%、D P P Cに対して約0.5モル%、マレイミド化D P P Eに対して約17
5 モル%の導入量でプラトーに達することが確認できた。なお、リポソームからD X Rが漏れた場合には、漏出したD X Rは血中から速やかに焼失することが確認されているので、実施例2及3の結果に示された血漿中D X R濃度は、リポソームに封入されたD X Rに由来
10 するものであると考えられる。

実施例4：P E G及び抗体結合リポソームの作製（薬効試験、動態試験）

実施例1の方法に従って、リポソーム全脂質100
15 m gに対して抗体を0.5、1.2、2.0、4.5、5.3、及び11.4 m g結合させた下記のリポソーム2～7（D X R封入、P E G 5000結合）を調製した。同様にして、抗体を結合していないリポソーム1を製造した。なお、P E G結合リポソームでは、
20 P E G結合量範囲（>4.4 m g / 100 m g脂質）において各リポソームの血中滞留性は同等であるため、以下に示す実験結果は抗体結合量に依存する。

<表3>

リボソーム	抗体結合量 mg/100mg 脂質	DXR封入量 mg/100mg 脂質	PEG結合量 mg/100mg 脂質
1	0	9.5	8.2
2	0.5	9.1	8.2
3	1.2	9.5	8.1
4	2.0	8.9	5.3
5	4.5	9.6	6.2
6	5.3	9.7	6.4
7	11.4	10.0	3.2

胃癌細胞株 M K N 4 5 をヌードマウスの背側 2 ヶ所
 (1×10^6 細胞 / 1 ヶ所) に皮下移植した。「薬効試験」においては、腫瘍の長径、短径の測定が可能な十分
 5 大な大きさに達した時点で、抗体結合量の異なるリボソームの投与を開始した。リボソームの投与量は、1 回あたり $5.0 \text{ mg} / \text{kg}$ (DXR 量換算) とし、陽性対照として DXR 投与群 ($5.0 \text{ mg} / \text{kg}$) を設け、コントロール群には生理食塩水を投与した。全群
 10 につき、投与開始日 (0 日) 、 3 日目、及び 6 日目に静脈内投与を行なった。

経時的に腫瘍径 (長径、短径) を測定し、推定腫瘍重量 ($\text{短径}^2 \times \text{長径} / 2$) を算定した。3 回の投与終了後、19 日目まで測定を継続した。各腫瘍の投与開始
 15 日の推定腫瘍重量を 1.0 として腫瘍増殖度を算出し、コントロール群、DXR 投与群に対する各処置群の腫瘍増殖抑制効果を評価した。最終測定日 (19 日目) の各処置群について % T / C 値 (処置群の腫瘍増殖度 / コントロール群の腫瘍増殖度 $\times 100$) を算定し、
 20 各サンプルの抗体結合量との関係から、腫瘍増殖抑制効果が最大となる抗体結合量 (最適値) を求めた。

その結果、コントロール群に対しては全ての処置群に有意な腫瘍増殖抑制効果が確認され、DXR 投与群

に対しては、第3図に示すように、結合抗体量が0.5 ~ 5.3 mg / 100 mg 全脂質の範囲のサンプルに有意な腫瘍増殖抑制性効果が認められ、抗体結合量として2 mg / 100 mg 全脂質付近をピークとした腫瘍増殖抑制活性が認められた。

- 「動態試験」においては、マウスに抗体結合量の異なる上記リポソーム4 ~ 7 (2.0、4.5、5.3、及び11.4 mg / 100 mg 全脂質) を静脈内投与し (一群2 ~ 3匹、1.0 mg / kg、DXR量換算)、
- 10 投与4時間後に各個体から血漿を採取した。実施例2と同様に蛍光測定法により血漿中のDXR量を測定した。各サンプル投与後の血漿中のDXR量を比較し、抗体結合量とDXR封入抗体結合リポソームの血中滞留性との関係を求めた。動態試験において抗体結合量
- 15 2 mg / 100 mg 脂質以上の各サンプルについて、各サンプル投与後の血漿中DXR量と各サンプルの抗体結合量との関係を求めた (第4図)。その結果、抗体結合量が2 mg / 100 mg 脂質を上回ると、抗体結合量に依存して血中滞留性が低下することが認めら
- 20 れた。

産業上の利用可能性

- 本発明のリポソームは、優れた血中滞留性を有しており、しかもポリアルキレングリコールの結合量が従
- 25 来のリポソームに比べて少ないという特徴がある。したがって、本発明のリポソームは、ポリアルキレングリコールに起因する副作用を回避することができ、また、工業生産性の観点からも有利である。さらに、本発明のリポソームは、従来の抗体結合リポソームに比

べて、優れた治療効果を達成できるという特徴がある。

請求の範囲

1. 脂質末端の一部がマレイミド化されたリポソームにポリアルキレングリコール部分を含む化合物をチオ
5 エーテル基を介して結合したリポソームであって、該化合物の結合量がリポソームに含まれるマレイミド化脂質1モルに対して15～50モル%であるリポソーム。
2. 該化合物の結合量がマレイミド化脂質1モルに対して15～30モル%である請求項1に記載のリポソ
10 ーム。
3. 該リポソームが、マレイミド化脂質のマレイミド基と、チオール基を付加したポリアルキレングリコール部分を含む化合物とを反応させることにより得られ
15 るリポソームである、請求項1又は2に記載のリポソーム。
4. 該化合物がリポソームの表面に結合した請求項1乃至3のいずれかに記載のリポソーム。
5. ポリアルキレングリコールがポリエチレングリ
20 コールである請求項1乃至4のいずれかに記載のリポソーム。
6. 該化合物が2つのポリエチレングリコール基を有する化合物である請求項5に記載のリポソーム。
7. ポリエチレングリコールの分子量が2,000～
25 7,000ダルトンである請求項6に記載のリポソーム。
8. ポリエチレングリコールの分子量が約5,000ダルトンである請求項6に記載のリポソーム。
9. リポソームの表面にさらに抗体が結合した請求項

1乃至8のいずれかに記載のリポソーム。

10 10. 脂質末端の一部がマレイミド化されたりポソームに抗体をチオエーテル基を介して結合したりポソームであって、該抗体の結合量がリポソームに含まれる
5 マレイミド化脂質1モルに対して0.1～2モル%であるリポソーム。

11. 該抗体の結合量がマレイミド化脂質1モルに対して0.4～0.7モル%である請求項10に記載のリポソーム。

10 12. 該リポソームが、マレイミド基を有するリポソームと抗体由来のイオウ含有基とを反応させてチオエーテル結合を形成することにより得られるリポソームである、請求項10又は11に記載のリポソーム。

15 13. 抗体がGAH抗体である請求項10乃至12のいずれかに記載のリポソーム。

14. 抗体が抗体フラグメントがF(ab')₂である請求項10乃至13のいずれかに記載のリポソーム。

20 15. リポソームの表面にさらにポリアルキレングリコール部分を含む化合物が結合した請求項10乃至14のいずれかに記載のリポソーム。

16. 脂質末端の一部がマレイミド化されたりポソームにポリアルキレングリコール部分を含む化合物及び抗体をチオエーテル基を介して結合したりポソームであって、該化合物の結合量及び該抗体の結合量が、リ
25 ポソームに含まれるマレイミド化脂質1モルに対して15～30モル%及び0.4～0.7モル%であるリポソーム。

17. 該リポソームが、マレイミド化脂質のマレイミド基と、チオール基を付加したポリアルキレングリコ

ール部分を含む化合物とを反応させることにより得られるリポソームである、請求項 16 に記載のリポソーム。

18. 該化合物がリポソームの表面に結合した請求項 5 16 又は 17 に記載のリポソーム。

19. ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである請求項 16 乃至 18 のいずれかに記載のリポソーム。

20. 該化合物が 2 つのポリエチレングリコール基を有する化合物である請求項 19 に記載のリポソーム。

21. ポリエチレングリコールの分子量が 2,000 ~ 7,000 ダルトンである請求項 20 に記載のリポソーム。

22. ポリエチレングリコールの分子量が約 5,000 ダルトンである請求項 20 に記載のリポソーム。

23. 該リポソームが、マレイミド基を有するリポソームと抗体由来のイオウ含有基とを反応させてチオエーテル結合を形成することにより得られるリポソームである、請求項 16 乃至 22 のいずれかに記載のリポソーム。

24. 抗体が GAH 抗体である請求項 16 乃至 23 に記載のリポソーム。

25. 抗体が抗体フラグメントが $F(a b')$ である請求項 16 乃至 24 のいずれかに記載のリポソーム。

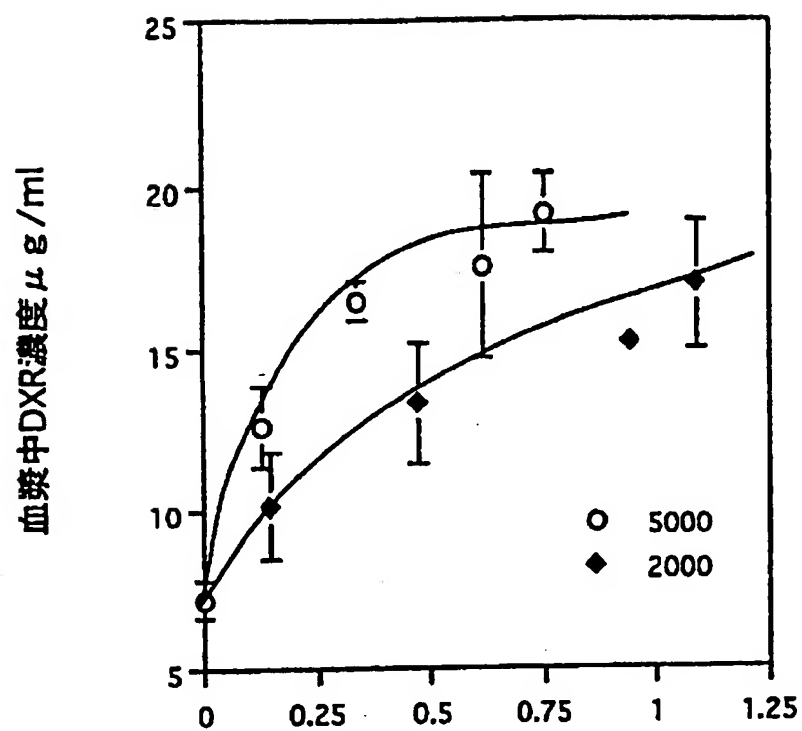
26. 請求項 1 乃至 25 に記載の癌治療薬。

27. 癌種が胃癌又は大腸癌である請求項 26 に記載の癌治療薬。

28. 請求項 1 乃至 27 のいずれかに記載のリポソームを用いた癌治療方法。

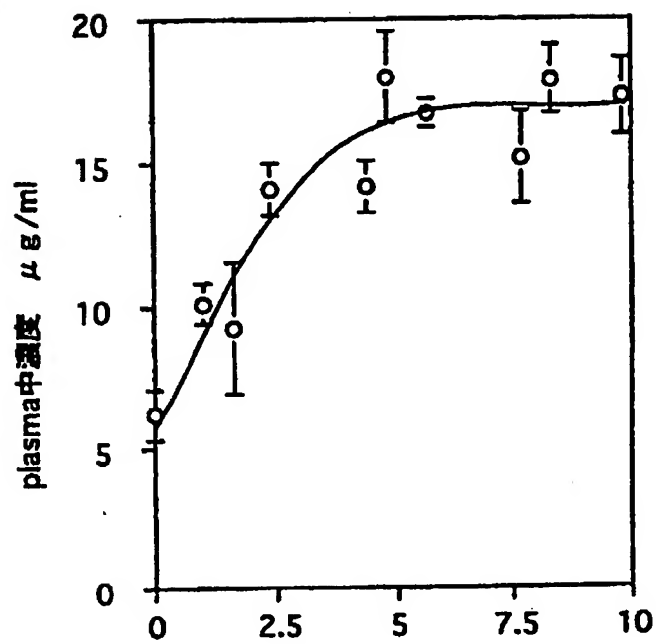
1 / 4

第 1 図



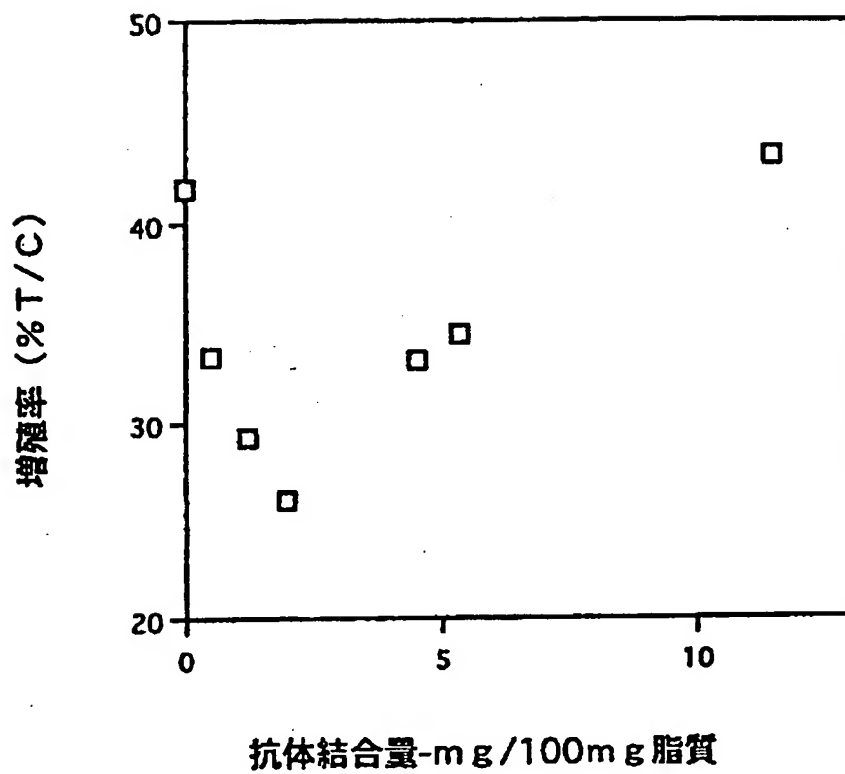
2 / 4

第 2 図



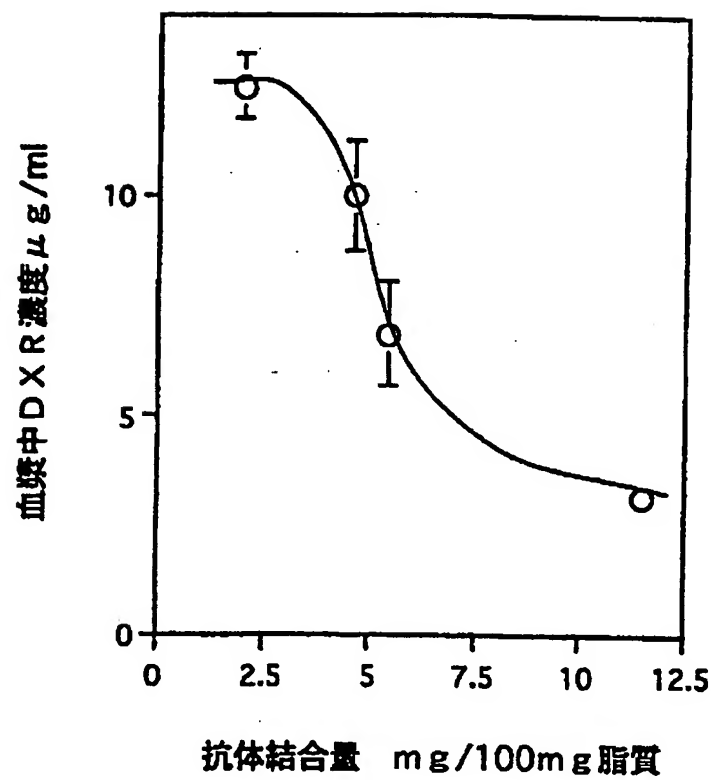
3 / 4

第 3 図



4 / 4

第 4 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02596

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K9/127, A61K47/48, A61K39/395, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K9/127, A61K47/48, A61K39/395, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN)

MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, 526700, A (Mitsubishi Kasei Corp.), 10 February, 1993 (10.02.93)	10-14
A	& JP, 4-346918, A	1-9, 15-27
A	Biochemistry, 36, (1), 66-75 (1997)	1-27
A	Journal of Controlled Release, 40, (1-2), 101-109 (1996)	1-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 July, 2000 (18.07.00)Date of mailing of the international search report
01 August, 2000 (01.08.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02596

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 28
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:


The subject matter of claim 28 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international search report by the International Search Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K9/127, A61K47/48, A61K39/395, A61P35/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K9/127, A61K47/48, A61K39/395, A61P35/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN) MEDLINE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP, 5 2 6 7 0 0, A (Mitsubishi Kasei Corp.) 10. 2月. 1993 (10. 02. 93)	10-14
A	& JP, 4-346918, A	1-9, 15-27
A	Biochemistry, 36, (1), 66-75 (1997)	1-27
A	Journal of Controlled Release, 40, (1-2), 101-109 (1996)	1-27
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>		
国際調査を完了した日 18. 07. 00	国際調査報告の発送日 01.08.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 横尾 俊一 電話番号 03-3581-1101 内線 3490	4 P 9840 

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 28 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲28は、治療による人体の処置方法であり、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)に該当するため、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。